DOI:10.11931/guihaia.gxzw201712023

大豆不同生育期[1]根际土壤细菌群落结构的变化

刘欣，李志英，刘瑞瑞，李璐璐，王卫卫

(西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 陕西省 西安 710069)

摘要：定植于大豆根际的细菌群落结构多样性的变化对植物的生长和作物的生产力起到重要作用，然而关于大豆生长过程中细菌群落结构变化的研究较少。本实验采集大豆苗期和成熟的根际土壤作为研究材料，采用 Illumina 高通量测序技术测定细菌 16S rRNA V3+V4 区序列，探究大豆不同生育期根际土壤细菌群落结构的变化。经原始数据的拼接、过滤、去除嵌合体序列和聚类分析等数据处理过程，并对 OTU 进行分类学注释。在此基础上运用 ANOVA 分析物种组成变化，Alpha 多样性指数研究细菌多样性变化。结果表明细菌丰富度和多样性在不同生育期有显著变化，其中成熟期土壤中的细菌丰富度和多样性指数均明显高于苗期；变形菌、放线菌、酸杆菌是大豆根际的优势菌门，其含量在不同生育期也有显著变化；假诺卡氏菌属、糖丝菌属、鞘氨醇单胞菌属是大豆根际的优势菌属，这些菌属中的部分菌群属于根际促生菌，具有潜在的促生效应。这些结果证实大豆的生育期对根际土壤细菌群落结构有重要影响。这些研究结果为了解大豆根际细菌群落结构多样性及根际细菌群落结构的变化提供了理论依据。

关键词：生育期，大豆，根际土壤，细菌群落，Illumina 高通量测序

Changes of bacterial flora structure in rhizosphere soil of soybean at different growth stages

LIU Xin, LI Zhi-Ying, LIU Rui-Rui, LI Lu-Lu, WANG Wei-Wei

(Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China，Ministry of Education，*Faculty of Life Sciences*，*Northwest University*，Xi'an 710069，Shaanxi Province，China)

Abstract: The rhizosphere microorganisms are the soil microbial community that was the most affected by the plants and have a close relationship with the growth and development of the plants. The diversity communities of bacterial inhabiting soybean rhizosphere play an important role in plant growth and crop production; however, little was known about the changes that occur in these communities during growth. In the 9 hypervariable regions (V1 ~ V9) of the 16S rDNA gene, V3 ~ V4 is the most accurate and recognizable to the genera. Soybean rhizosphere soils at seedling and maturity stages were collected in this experiment as the research material, and Illumina high-throughput sequencing technology was used to determine the 16S rDNA V3+V4 region sequence of bacteria, in order to explored the soybean community rhizosphere soil bacterial community structure at different growth stages. The original Tags data was used by splicing, filtering, removal of chimeric sequences and cluster analysis of data processing, OTU taxonomic annotation. On this basis, the changes of species composition were analyzed by ANOVA method, and the diversity of bacterial composition was also studied by alpha diversity index. The results showed that there was a significant change in the abundance and diversity of bacteria at different growth stages. Diversity index analysis showed that the abundance and diversity at mature stage was significantly higher than seedling stage in soybean rhizosphere soil. Species composition analysis results showed that *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Acidobacteria* are the dominant rhizosphere bacteria at phylum level and its contents in different growth stages also have significant increase. ANOVA analysis showed that the abundances of *Proteobacteria* and *Acidobacteria* were significantly different, and *Actinobacteria* was not significantly different at different growth stages. *Pseudonocardia*, *Saccharomyces* and *Sphingomonas* are the dominant genus in the rhizosphere of soybean. Some of these genera belong to Plant Growth-Promoting Rhizobcteria and have the potential capacity for promoting growth. These results confirmed that the growth period of soybean has an

1收稿日期：2017-12-18

基金项目：国家自然科学基金（41571243）[Supported by the National Natural Science Foundation(41571243)]。

作者简介：刘欣(1991-)，女，山西省和顺县人，硕士研究生，研究方向豆科植物根际氢氧化细菌的研究，（E-mail）861701086@qq.com。

通讯作者：王卫卫，博士，教授，主要从事豆科植物-根瘤菌共生固氮生态生理学及根际微生物多样性研究，（E-mail）wwwang@nwu.edu.cn。

important influence on the bacterial community structure in rhizosphere soil. These results provide a theoretical basis for understanding the diversity of bacterial community structure and the changes of bacterial community structure in soybean rhizosphere .

Key words: development phase, soybean, rhizosphere soil, bacterial flora, Illumina high-throughput sequencing

大豆是一种重要的农作物，在世界范围内都有广泛的种植。它在很多领域（食品、畜禽养殖饲料等）都有广泛的应用，也是我国的主要粮食和重要的油料作物(Susser & Uzzell, 1991；李亮等，2016；陈允正等，2011)。大豆是我国的传统作物，其种植面积位于水稻、小麦、玉米之后，占我国粮食播种面积的 8%-10%(蒋秋林，2010)。目前我国对大豆的需求量大幅上升，自给率持续走低，主要依靠进口大豆来维持需求(毕影东等，2014；张振华和刘志民，2009)。因此，越来越多人开始研究如何提高大豆产量，以供应国内大豆的需求。

根际土壤是指处于植物根际周围受根系生长直接影响的土壤，根际微生物是受植物影响最大的土壤微生物群体，与植物的生长发育关系密切(陈文新等，2003)。根际微生物群落结构的变化对土壤中物质和能量的循环、有机质的分解与合成等方面产生重要影响（Preston et al，2002；徐文静等，2014）。研究表明，影响根际微生物群落结构变化因素有很多，不同植物间、同一植物的不同基因型，甚至同一植物的不同生育期其根际微生物的数量、种类也有很大差别(Marschner et al，2001)。已有研究称根际分泌物为根际微生物的生长提供营养和能源物质，其对微生物的数量，种类，分布及微生物的生长都有一定的影响(张淑香和高子勤，2000)。植物生长又与根际微生物息息相关，根际微生物的生理活动对土壤性状、植物养分吸收、植物的生长发育都有明显的影响；并且根际微生物的种群与植株的健康状况有关，很大程度上决定作物的产量与品质(胡小加，1999)。有些根际微生物可以产生激素类物质促进土壤有机质分解、诱导植株增加抗性等，或者通过争夺营养占领生态位等方式抑制病原菌的生长来间接促进植物的生长(周文杰等，2016)。根际微生物群落结构失调，可能会导致病原菌数量的增加，从而使作物减产。目前，有关于大豆与根际微生物的相互作用的研究大多集中于大豆根际与根瘤菌和丛枝菌根真菌的共生关系(Jie et al, 2013; Denison & Kiers, 2011)。然而，根际土壤微生物种类繁多，各种微生物的相互作用可能影响大豆与根瘤菌和丛枝菌根真菌的相互作用。大豆在生长过程中与根际微生物相互作用的机制仍然不明确。Xu YX 等(2009)利用 DGGE 研究大豆根际微生物表明，放线菌门、变形菌门、拟杆菌门和酸杆菌门的相对丰度随着大豆生育期的变化而变化。了解不同生育期大豆根际细菌群落结构的变化，对评价生育期对土壤微生物多样性的影响具有重要意义。

一直以来由于大多数的微生物在营养培养基中可培养性低或不能被培养的缺陷严重制约了微生物多样性的研究(Kamagata & Tamaki, 2005)。随着分子生态学研究技术的发展，以 DNA 为基础的分子分析技术，如 PCR-RFLP、DGGE/TGGE、SSCPP 等可以克服传统培养技术的限制，从分子水平来直接分析微生物群落结构的变化，然而这些技术存在检测限低工作量大、灵敏度低等缺陷(You et al，2014)。相较于以上研究手段，高通量测序技术具有速度快，耗时少，成本低廉，准确度高等优点，能更为真实的反应环境中群落的特点。目前，高通量测序技术主要是 Illumina、Roche454 和 Life Technologies 等公司开发的测序平台(楼骏等，2014)。Illumina HiSeq 2500 在一个运行周期 7 天的时间里可以产出 600G 的数据量，具有数据通量高、准确率高、成本可控等优点(Quail et al，2012)。

本研究以大豆为实验材料，采集大豆苗期和成熟期的根际土样。运用 Illumina 测序平台对土壤样品 16S rDNA 进行了高通量测序技术，探究两个不同生育期的大豆根际土壤细菌群落结构多样性及变化，这对评价生育期对土壤微生物多样性的影响具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本实验所用土壤样本采集于陕西省咸阳市(34°11′N，107°38′E，暖温带大陆性季风气候，年平均气温 13.4℃ 降水量 519.2mm，日照 2175h)大豆大田。采用“S 形采样法”在大豆田中选择 5 个采样点，按照 Riley & Barber 等（1969）的抖落法，用无菌小刷子刷取粘着于植物根上的土壤，五个植株的土壤合为一个样本，最终将采集完成的样本过 2.0mm 筛，混合均匀分为三份，放置于-20℃冰箱中保存。样品采自苗期（2016 年 6 月 24 日），样品号为

DWA；成熟期（2016 年 9 月 30 日），样品编号为 DYA，共 6 个样本(两个时期，3 个重复)。

1.2 土壤总 DNA 的提取与电泳检测

使用 PowerSoil®DNA Isolation Kit（MoBio，美国）提取土壤总 DNA，经琼脂糖凝胶电泳定性检测后，再采用核酸定量分光光度计（NanoDrop，美国）测定浓度后置于-20℃冰箱中保存备用。

1.3 16S rRNA V3+V4 区的 PCR 扩增及测序

以提取的总 DNA 作为模板，以 338F（5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'）和 806R（5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'）为引物(Xiaoling et al, 2015)，对细菌的 16S rRNA V3+V4 区进行扩增。PCR 反应体系共 50μL：基因组 DNA 40-60 ng，*Vn F（10μM) 1.5μL，*Vn R（10μM) 1.5 μL，Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0.2 μL，High GC Enhancer 10 μL，Bμffer 10 μL，dNTP 1 μL，ddH$_2$O 补至总体系 50μL。反应程序为：95℃预变性 5min，进行 15 次循环（95℃变性 1min，50℃退火 1min，72℃延伸 1min），72℃最终延伸 7min。对 PCR 产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库，对建好的文库先进行文库质检，质检合格的文库用 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序，PCR 扩增及测序工作由北京百迈客公司完成。

1.4 数据分析

测序完成后，使用 FLASH v1.2.7 软件，通过 overlap 对每个样品的测序片段进行拼接，得到的拼接序列即原始数据；使用 Trimmomatic v0.33 软件，对原始数据进行过滤，得到高质量的过滤后数据；使用 Uchime v4.2 软件，鉴定并去除嵌合体序列，得到最终有效数据。使用 QIIME（version 1.8.0）软件中的 Uclust 对序列按 97%的相似度水平下进行聚类、获得样品的 OUT 分类数据，并基于 Silva（细菌）分类学数据库对 OTU 进行分类注释。

2 结果

2.1 样品序列数特点

对各样本细菌的 16S rRNA V3+V4 区测序，经数据前处理，最终得到的测序长度集中在 280-460bp 之间，且 2 个样品共产生 1919 个 OTU。各样本统计结果见表 1。从样本中随机抽取一定数量的序列，统计这些序列所代表的物种数目，并以序列数与物种数来绘制稀释性曲线，如图 1 示。随着测序条数的增加，曲线逐渐趋于平缓，说明测序深度已经足够。

表 1 样品的 seg 信息及 OTU 统计分析

Table 1 seg information and OTU statistical analysis of samples

样品编号 Sample ID	OTU 数 Number of OTUs	序列数 Number of sequences
DWA	1847	57996
DYA	1804	51807
Total	1919	109803

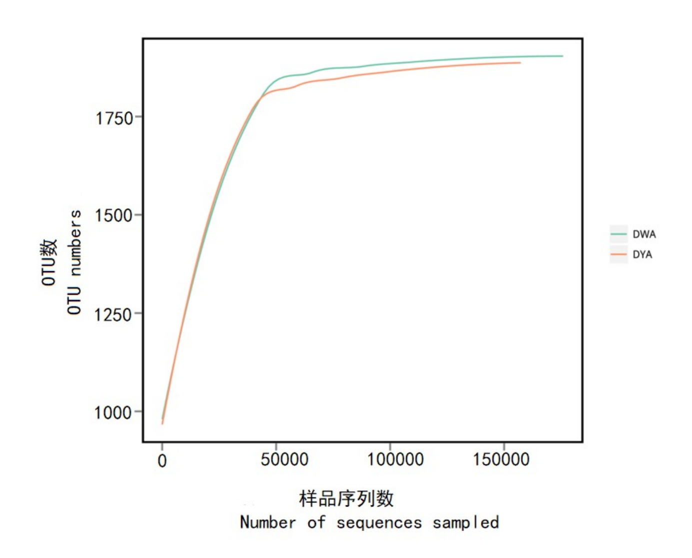


图 1 大豆根际土壤样品细菌测序的稀释曲线

Fig. 1 Dilution curve of bacteria sequencing in soybean rhizosphere soil samples

2.2 物种组成分析

物种组成分析反映样品在不同分类学水平上的群落结构。图 2(a)和图 2(b)分别展示门(phylum)水平和属(genus)水平的群落结构和分类比较结果，相对含量前十的菌门是放线菌门（*Actinobacteria*）、变形菌门（*Proteobacteria*）、酸杆菌门（*Acidobacteria*）、芽单胞菌门（*Gemmatimonadetes*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、绿弯菌门（*Chloroflexi*）、疣微菌门（*Verrucomicrobia*）、硝化螺旋菌门（*Nitrospirae*）、浮霉菌门（*Planctomycetes*）、装甲菌门（*Armatimonadetes*）。在属水平，优势属主要有变形菌门的 *Sphingomonas*、*H16*、*Phaselicystis*、*haliangium*，酸杆菌门的 *RB41*、*Bryobacter*，放线菌门的 *Pseudonocardia*、*Saccharothrix*、*Nocardioides*，还有相对丰度较高的未分类菌属。不同生育期的土样中细菌的菌群分布有差异，其中在样品 DYA 中变形菌门、芽单胞菌门的丰度有所下降，其他菌门的丰度都有不同比例的上升。从属水平上，相较于 DWA，样品 DYA 中 *Sphingomonas*，*Pseudonocardia* 的丰度有明显的下降，而 *RB41* 的含量明显上升。

分别对样品在门分类水平和属分类水平进行 ANOVA 分析，发现在门水平上丰度排名前十的门中除放线菌门，浮霉菌门，装甲菌门外，其他菌门都存在显著差异，其中变形菌门的差异极显著（p=0.00081）；在属分类水平上，差异显著的属注释到 *Pseudonocardia*(P=0.000839)，*Phaselicystis*(P=0.000144)，*Saccharothrix*(P=0.000404)，*RB41*(p=0.001633)，*Nocardioides* (p=0.011744)，其中差异最为显著的属为 *Phaselicystis*。

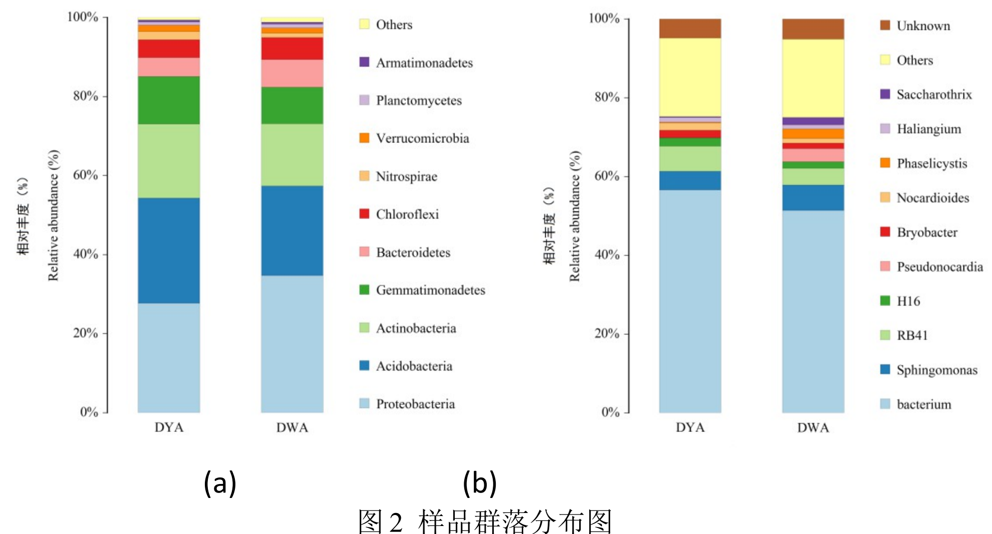


图 2 样品群落分布图

Fig. 2 microbial communities from samples

注：（a）门水平样品群落分布图；(b)属水平样品群落分布图

Note: (a) frequence of phylum in microbial communities from samples; (b) frequence of genus in microbial communities from samples

表 2 门水平主要菌群相对丰度 ANOVA 方差分析

Table 2 Comparison of the relative abundances of major flora at the phylum level ANOVA analysis of variance

门 Phylum	P 值 P value	Q 值 Q value
放线菌门 *Actinobacteria*	0.118938	0.156497
变形菌门 *Proteobacteria*	0.000881	0.00734
酸杆菌门 *Acidobacteria*	0.001117	0.006984
芽单胞菌门 *Gemmatimonadetes*	0.001442	0.006009
拟杆菌门 *Bacteroidetes*	0.002821	0.007836

绿弯菌门 *Chloroflexies*	0.019238	0.036997
疣微菌门 *Verrucomicrobia*	0.028427	0.044417
硝化螺旋菌门 *Nitrosipirae*	0.002732	0.008537
浮霉菌门 *Planctomycetes*	0.128375	0.160468
装甲菌门 *Armatimonadetes*	0.346699	0.393976

表 3 属水平主要菌群相对丰度 ANOVA 方差分析

Table 3 The relative abundance of the main genus of the genus ANOVA analysis of variance

属 Genus	P 值 P value	Q 值 Q value
鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*	0.019744	0.061576
RB41	0.001633	0.010731
假诺卡氏菌属 *Pseudonocardia*	0.000839	0.008124
H16	0.09911	0.175349
Bryobacter	0.014755	0.051226
类诺卡氏菌 *Nocardioides*	0.011744	0.04322
Phaselicystis	0.000144	0.005309
Haliangium	0.499945	0.585923
糖丝菌属 *Saccharothrix*	0.000404	0.006188

2.3 细菌群落多样性分析

2 个样品 Alpha 多样性指数，Shannon，Simpson，Ace，Chao1 四个指数见表 4 所示。Shannon DYA＞DWA，Simpson DYA＜DWA。

表 4 样品的 Alpha 多样性

Table 4 Alpha diversity of samples

样品编号 Sample ID	Shannon 指数 Shannon Index	Simpson 指数 Simpson Index	Ace 指数 Ace Index	Chao1 指数 Chao1 Index	覆盖率 Coverage
DWA	6.289446	0.005808	1911.490588	1915.968750	0.9979
DYA	6.442155	0.004279	1900.530122	1908.023256	0.9978

2.4 NMDS 分析结果

NMDS 分析（Nonmetric Multidimensional Scaling），即非线性多维标度分析，常用于比对样本组之间的差异。所有样品的 NMDS 图如图 3 所示，样品点的分布代表样品间相似的程度，从图中可以看出样品 DYA 与 DWA 明显位于不同的象限内，说明两个样品间相似度不高。

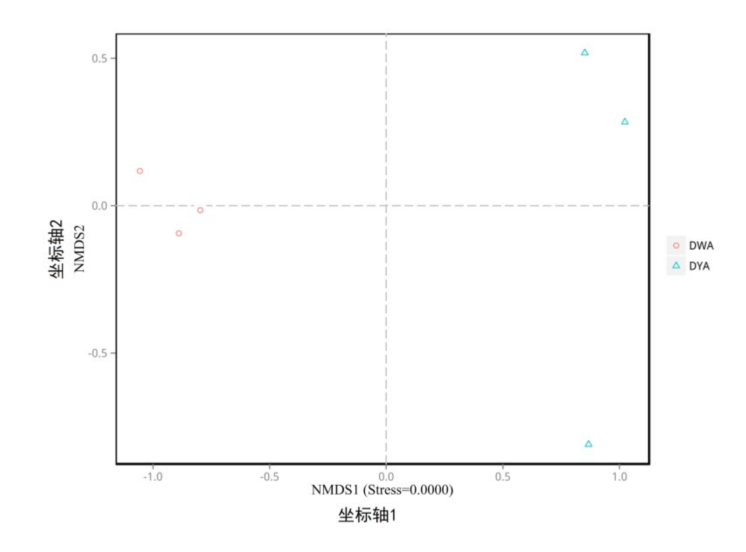


图 3 NMDS 分析

Figure3 Non-metric multidimensional scaling analysis

3 结论与讨论

细菌是土壤微生物中的重要组成部分，其种类、数量对土壤的生物化学性质及土壤养分有直接影响。Illumina 高通量测序技术具有快速、方便、准确性高等特性，而广泛应用于土壤微生物多样性的研究。本研究通过此方法分析大豆两个不同生育期根际土壤中细菌的群落结构及多样性。经该方法得到的结果显示各个样本的覆盖率均在 99%以上，证明本次测序结果能够反应样本的真实情况。

本研究发现，所有样品中共含有 25 个细菌门。其中变形菌、酸杆菌、放线菌 3 大门类的相对丰度最高。葛红朝等(2015)分析了稻田土壤细菌的群落结构，发现变形菌、酸杆菌和绿弯菌是稻田土壤优势细菌，其次是放线菌。Jangid 等(2008)研究发现变形菌在不同类型的耕作土壤中都是绝对优势菌属，其次是酸杆菌。杨菁等(2015)对降香黄檀不同混交林土壤细菌多样性研究发现，土壤中主要菌群有变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、绿弯菌门。牛世全等(2017)分析了河西走廊地区盐碱土壤群落结构，发现变形菌门含量最高，占 28.56%；其次是放线菌门，占 17.2%；拟杆菌门占 12.3%。本研究发现，在大豆根际土壤中变形菌门的含量最高，其次是酸杆菌门，放线菌门，而绿弯菌门的含量较少，这可能于地理因素引起的生态多样性、土壤营养情况和作物种类有关。本研究中，相对丰度较高的菌属有：*Sphingomonas*、*H16*、*Phaselicystis*、*Haliangium*、*RB41*、*Bryobacter*、*Pseudonocardia*、*Saccharothrix*、*Nocardioides*。假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)属于放线菌门，该属微生物在产生抗生素和维生素降解方面有重要作用(Carr et al, 2012; Cuesta et al, 2013)，此外还发现该属的某些菌株还能产生维生素、酶类等重要的生物活性物质(吕志堂和刘志恒, 1999)。糖丝菌属（*Saccharothrix*）属于放线菌门，该属的微生物在纤维素降解和生物防治方面有重要的作用，王丽娟等(2007)研究表明橘色糖丝菌对大豆种传病原真菌有良好的防治效果。鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)属于变形菌门，该属微生物在降解复杂有机物方面有重要的作用(胡杰等，2007)，另外还发现该属的某些微生物能分泌吲哚-3-乙酸促进植物生长(Tsavkelova et al, 2007)，但该属也包括一些致病菌，如鞘氨醇单枯病(Buonaurio et al, 2002)。我们发现大豆根际菌群的丰度在不同生育期有一定的变化。这可能是由于大豆在生长过程中根际分泌物发生了变化，有报道称在拟南芥的生长过程中根际微生物的变化与根际分泌物有关(Chaparro et al, 2013)。

Alpha 多样性可以反映单个样品内部的物种多样性，Chao1 和 Ace 指数简单的反映出群落中物种的数量，而不表示群落中每个物种的丰度信息。Shannon 和 Simpson 指数用于衡量群落多样性，受样品群落中物种丰度和物种均匀度的影响，Chao1、Ace、Shannon 指数值越大，Simpson 指数值越小说明样品的物种多样性越高。本研究结果表明，Chao1 和 Ace 指数显示 DWA＞DYA，Shannon 指数显示 DWA＜DYA，Simpson 指数显示 DWA＞

DYA，Chao1 指数在所有样品间的趋势与加入了均匀度影响的 Simpson 指数不同，Haegeman 等（2013）指出，Chao1 指数在计算时加入了低丰度序列，会引起多样性的低估，且这种低估会随菌群物种数的增加而加大，这可能是本研究中采用不同多样性指数得到不一致结果的主要原因。NMDS 即非度量多维标定法，用于比较样本的组内或组间差异。NMDS 是非线性模型，能更好的反应样本间的差异，其效果优于 PCA/PCoA 等线性模型。本研究中 Stress=0.0000，表明 NMDS 分析可靠性高。结果显示样品 DWA 与 DYA 明显位于不同的象限内，说明两个样本间相似性不高，即生育期不同根际细菌的群落结构有一定的差异。有大量研究证实根际微生物的数量和群落结构会随生育期的不同而发生改变 Duineveld 等(2001)对菊花根际微生物研究发现，幼龄植株与成熟植株根际土壤微生物群落结构差异较大。Farina 等(2012)研究发现，油菜根际微生物群落结构因生育期不同而不同，莲座期的丰度最高。张健(2014)运用 DGGE 技术对大豆根际细菌群落结构进行研究发现，盛花期的细菌多样性高于成熟期。Yanxia 等(2009)依据 DGGE 图谱发现，大豆根际细菌多样性呈现先增加后降低的趋势，从初花期开始增加，到鼓粒期达到最大，成熟期最低。本研究发现大豆生育后期的微生物多样性高于生育前期，与张健、Yanxia Xu 等结果不一样可能与 DGGE 技术本身的缺陷有关，该技术仅能分析优势的微生物菌群，且检测限低，随机性大，可能低估微生物群落大小和多样性；另外与作物品种、土壤营养状况、地理环境因子等因素相关。

本研究运用高通量测序技术探究两个不同生育期大豆根际土壤中细菌群落结构变化。通过对大豆两个生育期根际土壤分析可知，成熟期土壤的多样性指数高于苗期根际土壤，这表明大豆的生育期对根际土壤细菌群落结构有重要影响。本研究为了解大豆根际细菌群落结构多样性及根际细菌群落结构的变化提供理论依据。

参考文献

BI YD, LI W, XIAO JL, et al, 2014. Soybean molecular breeding: current status, challenges and perspectives[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 06(30): 30-39. [毕影东, 李炜, 肖佳雷等, 2014. 大豆分子的育种现状、挑战与展望[J]. 中国农学通报, 6(30): 30-39.]

Buonaurio R, Stravato V M, Kosako Y, et al, 2002. Sphingomonas melonis sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 52(Pt 6): 2081.

Carr G, Derbyshire, ER, Caldera E, et al, 2012. Antibiotic and antimalarial quinones from fungus-growing ant-associated pseudonocardia sp.[J]. J Nat Prod-lloydia, 75(10): 1806.

Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, et al, 2013. Root exudation of phytochemicals in arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions[J]. Plos One, 8(2): 525-534.

CHEN WX, LI FL,YAN ZC, 2003. Retrospect and prospect of soil microbiology and biological nitrogen fixation researches in China[J]. World Sci-tech R & D, 24(4): 6-12. [陈文新, 李阜隶, 闫章才, 2003. 我国土壤微生物学和生物固氮研究的回顾和展望[J]. 世界科技研究与发展, 24(4): 6-12.]

CHEN YZ, YANG XS, GERI LT et al, 2011. Analysis of change characteristics in Chinese main oil crops and edible vegetable oil industry[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 39(3), 197-201. [陈允正, 杨校生, 格日乐图等, 2011. 中国主要油料作物及食用植物油产业变动特征[J]. 山西农业科学, 39(3), 197-201.]

Cuesta G, Soler A, Alonso J L, et al, 2013. Pseudonocardia hispaniensis sp. nov., a novel Actinomycete isolated from industrial wastewater activated sludge[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 103(1): 135-142.

Denison RF, Kiers ET, 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi[J]. Curr Biol, 21: R775–R785.

Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, et al, 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 67(1): 172-178.

Farina R, Beneduzi A, Ambrosini A, et al, 2011. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth[J]. Appl Soil Ecol, 48(1): 44-52.

Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, et al, 2013. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice[J]. Isme Journal, 7(6): 1092-1101.

HU J, He XH, LI DP, et al, 2007. Progress in research of Sphingomona[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 13(3): 431-437. [胡杰, 何晓红, 李大平等, 2007. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 13(3): 431-437.]

HU XJ, 1999. Rhizosphere microorganisms and plant nutrition[J]. Chinese journal of oil crop sciences, 21(3): 77-79. [胡小加. 根际微生物与植物营养[J]. 中国油料作物学, 21(3): 77-79.]

Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, et al, 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems[J]. Soil Biol Biochem, 40(11): 2843-2853.

JIANG QL, 2010. China's soybean acreage factors[D]. Nan Jing: Nanjing Agricultural University: 1-58. [蒋秋林. 我国大豆播种面积的影响因素研究[D]. 南京：南京农业大学：1-58.]
Jie W, Liu X., Cai, B, 2013. Diversity of rhizosphere soil arbuscular mycorrhizal fungi in various soybean cultivars under different continuous cropping regimes[J]. Plos One, 8(8): e72898.
Kamagata Y & Tamaki H, 2005. Cultivation of uncultured fastidious microbes[J]. Microbes & Environments, 20(2): 85-91.
LI L, WEI LN, CUI JQ, et al, 2016. Effects of Funneliformis mosseae on the arbuscular mycorrhizal fungal community structure of root systems at the branching stage of continuous soybean cropping[J]. Mycosystema, 35(7): 882-891. [李亮, 魏丽娜, 崔佳琦等, 2016. 摩西管柄囊霉 Funneliformis mosseae 对连作大豆分枝期根系 AM 真菌群落结构的影响[J]. 菌物学报, 35(7): 882-891.]
LOU J, LIU Y, LI Y, 2014. Review of high-throughput sequencing techniques in studies of soil microbial diversity[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 30(15): 256-260. [楼骏, 柳勇, 李延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展[J]. 中国农学通报, 30(15): 256-260.]
LV ZT & LIU ZH, 1999. A review on taxonomy research of Pseudonocardiaceae[J]. Microbiology China, 26(3): 210-215. [吕志堂和刘志恒, 1999. 假诺卡氏菌科的分类学研究进展[J]. 微生物学通报, 26(3): 210-215.]
Marschner P, Yang C H, Lieberei R, et al, 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere[J]. Soil Biol Biochem, 33(11): 1437-1445.
NIU SQ, LONG Y, LI YH, et al, 2017. Microbial diversity in saline alkali soil from Hexi Corridor analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing system[J], Microbiology China, 44(9): 2067-2078. [牛世全, 龙洋, 李海云等, 2017. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析河西走廊地区盐碱土壤微生物多样性[J]. 微生物学通报, 44(9): 2067-2078.]
Preston MJ, Boddy I, Randerson PF, 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profile-a critique[J]. Fems Microbiol Ecol, 42(1): 1-14.
Quail M A, Smith M, Coupland P, et al, 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers[J]. Bmc Genomics, 13(1): 34-41.
Riley D & Barber SA. 1969. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean (Glycine max (L.) Merr.) root-soil interface[J]. Soil Sci Soc Amer J, 33(6): 905-908.
Susser JN & Uzzell G, 1991. Control of the soybean cyst nematode by crop rotation in combination with a nematicide[J]. J Nematol, 23(3): 344-347.
Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Klimova SY, et al, 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin[J]. Arch Microbiol, 188(6): 655–664.
WANG LJ, XU XD, JIANG Y et al, 2007. Study on control of soybean seed-borne pathogens by Saccharothrix tangerines XA-1[J]. Rain Fed Crops, 27(1): 46-48. [王丽娟, 徐秀德, 姜钰等, 2007. 橘色糖丝菌 XA-1 防治大豆种传病菌研究[J]. 杂粮作物, 27(1): 46-48.]
Xiaoling Zhang, Xiaoqing Tian, Liyan Ma et al, 2015. Biodiversity of the symbiotic bacteria associated with toxic marine dinoflagellate alexandrium tamarense[J]. Journal of Biosciences and Medicines, 03(6): 23-28.
XU WJ, JIN XD, YANG QS, 2014. Research progress on factors influencing plant rhizosphere microorganism[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 43(5): 6-12. [徐文静, 靳晓东, 杨秋生, 2014. 植物根际微生物的影响因素研究进展[J]. 河南农业科学, 43(5): 6-12.]
Xu YX, Wang GH, Jin J, et al, 2009. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage[J]. Soil Biol Biochem, 41(5): 919-925.
YANG J, ZHOU GY, TIAN YY, et al, 2015. Differential analysis of soil bacteria diversity in different mixed forests of Dalbergia odorifera[J]. Acta Ecologica Sinica, 35(24): 8117-8127. [杨菁, 周国英, 田媛媛等, 2015. 降香黄檀不同混交林土壤细菌多样性差异分析[J]. 生态学报, 35(24): 8117-8127.]
YOU YM, WANG J, HUANG XM, et al, 2014. Relating microbial community structure to functioning in forest soil organic carbon transformation and turnover[J]. Ecology and Evolution, 4(5): 633-647.
YUAN CH, WU H, GE TD, et al, 2015. Effects of long-term fertilization on bacterial and archaeal diversity and community structure within subtropical red paddy soil[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 26(6): 1807-1813. [袁红朝, 吴昊, 葛体达等, 2015. 长期施肥对稻田土壤细菌、古菌多样性和群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 26(6): 1807-1813.]
ZHANG J, 2014. Effects of sinorhizobium FrediiWGE03 and its sulfur metabolic mutants inoculation on soybean growth and rhizosphere bacterial communities[D]. Guang Xi: Guangxi university:1-81. [张健, 2014. 接种费氏中华根瘤菌 WGF03 及其硫代谢突变体对大豆生长和根际细菌群落的影响[D]. 广西: 广西大学: 1-81.]
ZHANG SX, GAO ZQ, 2000. Continuous cropping obstacle and rhizospheric microecology Ⅱ: Root exudates and phenolic acids [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 11(1): 152-156. [张淑香, 高子勤, 2000. 连作障碍与根际微生态研究, Ⅱ: 根系分泌物与酚酸物质[J]. 应用生态学报, 11(1): 152-156.]
ZHANG ZH & LIU ZM, 2009. The present situation of soybean supply and demand in China and the forecast analysis of the future ten years[J]. Soybean Science & Technology, (4): 16-21. [张振华和刘志民, 2009. 我国大豆供需现状与未来十年预测分析[J]. 大豆科技, (4): 16-21.]
ZHOU WJ, LV DG, QIN SJ, 2016. Research progress in interaction between plant and rhizosphere microorganism[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 38(3): 253 -260. [周文杰, 吕德国, 秦嗣军, 2016. 植物

与根际微生物相互作用关系研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 38(3): 253-260.]